



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118063606 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202410494182.6

(22) 申请日 2024.04.24

(71) 申请人 江西赛基生物技术有限公司

地址 330000 江西省南昌市南昌高新技术
产业开发区创新三路799号E厂房二
楼、D厂房三楼

申请人 杭州赛基生物科技有限公司

(72) 发明人 郭宣诚 徐陈槐 陈善问

(74) 专利代理机构 杭州信与义专利代理有限公
司 33450

专利代理师 万景旺

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

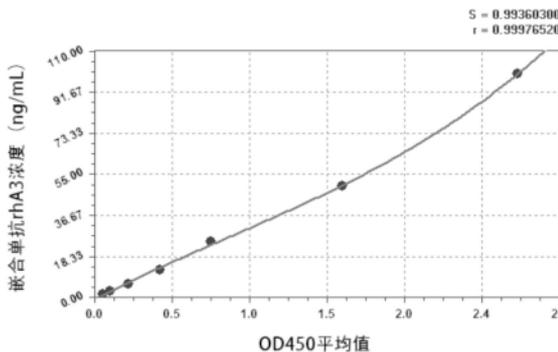
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种抗THSD7A单克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗THSD7A单克隆抗体及其制备方法和应用,属于抗体技术领域。本发明的抗THSD7A单克隆抗体为嵌合抗体,制备方法简单、来源可靠且批间稳定性好;利用本发明的抗THSD7A单克隆抗体作为检测THSD7A自身抗体的标准品,特异性好、灵敏度高、亲和力强,能够对pMN进行更加全面地诊断和预防,具有重大的临床应用价值。



1. 一种抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链可变区,其CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的氨基酸序列分别如SEQ ID No. 4~SEQ ID No. 6所示;

轻链可变区,其CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3的氨基酸序列分别如SEQ ID No. 9~SEQ ID No. 11所示。

2. 根据权利要求1所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链可变区,其氨基酸序列如SEQ ID No. 3所示;

轻链可变区,其氨基酸序列如SEQ ID No. 8所示。

3. 根据权利要求2所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述单克隆抗体为嵌合抗体。

4. 根据权利要求3所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链,其氨基酸序列如SEQ ID No. 14所示;

轻链,其氨基酸序列如SEQ ID No. 17所示。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述抗原结合部分选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和scFv中的任一种。

6. 编码权利要求1~5任一所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分的基因。

7. 一种重组载体,其特征在于,包括权利要求6所述的基因。

8. 一种重组细胞,其特征在于,包括权利要求7所述的重组载体。

9. 一种抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将权利要求6所述的基因克隆至表达载体上,得到重组载体,再将所述重组载体转染或转化至宿主细胞中,得到重组细胞,诱导所述重组细胞表达。

10. 权利要求1~5任一所述的抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于检测生物样本中抗THSD7A抗体的标准品的应用。

一种抗THSD7A单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体制备及免疫学检测技术领域,具体地,涉及一种抗THSD7A单克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 膜性肾病(Membranous Nephropathy, MN)是一种肾脏特有的自身免疫性疾病,其特点是肾小球的炎症,而肾小球通常有助于过滤液体和废物。MN是肾病综合征的主要原因,主要影响40岁以上的非糖尿病患者。在MN中,肾小球基底膜增厚,导致蛋白尿增加和肾脏功能的逐渐丧失。除蛋白尿外, MN还可表现为脂尿、高脂血症、低蛋白血症和水肿。MN有两种形式:原发性膜性肾病(pMN)和继发性膜性肾病(sMN)。

[0003] 肾脏活检是诊断pMN的标准。阳性结果通常显示肾脏中的沉积物。针对磷脂酶A2受体(the phospholipase A2 receptor 1, PLA2R)的肾脏自身抗体和人I型血小板域蛋白7A(thrombospondin type1 domain-containing 7A, THSD7A)的自身抗体是提供pMN可靠诊断的重大突破。目前针对pMN的研究更倾向于PLA2R的研究。但是已有研究证明,部分pMN患者循环自身抗体是THSD7A而非PLA2R,这表明抗THSD7A抗体阳性患者代表了pMN的独特亚群。因此了解THSD7A不仅加深了对MN基础的病理生理学理解,还可以通过血清检测来识别和检测抗THSD7A抗体阳性患者。在现有的相关试剂盒中,同时检测抗THSD7A抗体和抗PLA2R抗体为pMN的检测提供了一种全面的方法。

[0004] 然而,目前缺乏对抗THSD7A抗体检测用标准品的研究,本领域亟需制备简单、来源可靠、灵敏度高、特异性强和稳定性好的抗THSD7A抗体标准品。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

本发明第一方面提供一种抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链可变区,其CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的氨基酸序列分别如SEQ ID No. 4~SEQ ID No. 6所示;

轻链可变区,其CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3的氨基酸序列分别如SEQ ID No. 9~SEQ ID No. 11所示。

[0006] 在本发明的一些实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链可变区,其氨基酸序列如SEQ ID No. 3所示;

轻链可变区,其氨基酸序列如SEQ ID No. 8所示。

[0007] 在本发明的一些实施方案中,所述单克隆抗体为嵌合抗体。进一步地,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

重链,其氨基酸序列如SEQ ID No. 14所示;

轻链,其氨基酸序列如SEQ ID No. 17所示。

[0008] 在本发明的一些实施方案中,所述抗原结合部分选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和scFv中的任一种。

[0009] 在本发明中,所述抗原结合部分是指抗体的抗原结合片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体的抗原结合区或可变区,例如一个或多个CDR。抗体的片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。在本发明的一些实施方案中,所述抗原结合部分选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段和scFv抗体中的任一种。其中,

“Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。

[0010] “Fab'片段”含有一条轻链和一条包含VH结构域、CH1结构域以及CH1和CH2结构域之间的恒定区的部分的重链的部分,两个Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂片段。

[0011] “F(ab')₂片段”含有两条轻链和两条包含VH结构域、CH1结构域以及CH1和CH2结构域之间的恒定区的部分的重链的部分,由此在两条重链间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个Fab'片段组成。

[0012] “Fv片段”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0013] “单链Fv抗体(scFv抗体)”是指包含抗体的VH和VL结构域的抗原结合片段,这些结构域包含于单个多肽链中。

[0014] 本发明第二方面提供编码本发明第一方面任一所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的基因。

[0015] 在本发明的一些实施方案中,所述单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区,编码所述重链可变区的基因包括SEQ ID No. 2所示的核苷酸序列;编码所述轻链可变区的基因包括SEQ ID No. 7所示的核苷酸序列。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,所述单克隆抗体为嵌合抗体,包括重链和轻链,编码所述重链的基因包括SEQ ID No. 15所示的核苷酸序列;编码所述轻链的基因包括SEQ ID No. 18所示的核苷酸序列。

[0017] 本发明第三方面提供一种重组载体,包括本发明第二方面所述的基因。

[0018] 重组载体可以指克隆载体,也可以指表达载体,可以通过将编码核酸与商购的载体(如质粒或病毒载体)连接而获得,本发明中的重组载体不受特别限制,常用的质粒均可使用,如pSeTag2、PEE14、pMH3、pcDNA3.1、pcDNA3.4等。

[0019] 在本发明的一些具体实施方案中,将所述单克隆抗体的重链可变区(VH)及小鼠重链恒定区1(CH1)与人IgG4的Fc连接,形成杂合重链,再将所述抗THSD7A单克隆抗体的轻链可变区(VL)及小鼠κ链恒定区(CL)连接形成杂合轻链,将杂合重链和杂合轻链组合形成嵌合抗体。

[0020] 在本发明的一些优选实施方案中,所述小鼠重链恒定区1的氨基酸序列如SEQ ID No. 12所示;所述人IgG4的Fc的氨基酸序列如SEQ ID No. 13所示。在本发明的一些具体实施方案中,所述杂合重链的氨基酸序列如SEQ ID No. 14所示,其核苷酸序列如SEQ ID No. 15所示。

[0021] 在本发明的一些优选实施方案中,所述小鼠κ链恒定区氨基酸序列如SEQ ID No. 16所示。在本发明的一些具体实施方案中,所述杂合轻链的氨基酸序列如SEQ ID No. 17所示,其核苷酸序列如SEQ ID No. 18所示。

[0022] 本发明第四方面提供一种重组细胞,包括本发明第三方面所述的重组载体。

[0023] 所述重组细胞携带前面所述的基因、重组载体或转化子、或抗THSD7A单克隆抗体或抗原结合部分。所述重组细胞是通过转染或者转化所述重组载体获得的。

[0024] 根据本发明的实施例,所述重组细胞在适合条件下可高效表达上述抗THSD7A单克隆抗体。

[0025] 需要注意的是,本发明所述重组细胞不受特别限制,可以为原核细胞、真核细胞或噬菌体。所述原核细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核细胞可以为包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,草地粘虫等昆虫细胞,烟草等植物细胞,BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施例中,本发明所述重组细胞优选为哺乳动物细胞,包括BHK细胞、CHO细胞、NS0细胞或COS细胞,且不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

[0026] 需要说明的是,本申请说明书中所述的“适合条件”,是指适合本申请所述抗THSD7A单克隆抗体表达的条件。本领域技术人员容易理解的是,适合抗THSD7A单克隆抗体表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转染条件、健康的宿主细胞状态、合适的宿主细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制,本领域技术人员可根据实验室的具体环境,优化最适的所述抗THSD7A单克隆抗体表达的条件。

[0027] 本发明第五方面在提供一种抗THSD7A单克隆抗体或其抗原结合部分的制备方法,包括以下步骤:

将本发明第二方面所述的基因克隆至表达载体上,得到重组载体,再将所述重组载体转染或转化至宿主细胞中,得到重组细胞,诱导所述重组细胞表达。

[0028] 在本发明的一些实施方案中,所述单克隆抗体为嵌合抗体,包括重链和轻链,所述基因包括编码所述重链的核苷酸序列和编码所述轻链的核苷酸序列。由此,所述基因包括两条核苷酸序列,分别克隆至表达载体上得到两个重组载体并转化至同一宿主细胞中进行表达即可获得所述嵌合抗体。

[0029] 在本发明的一些实施方案中,所述制备方法包括以下步骤:

将本发明第三方面所述的重组载体转染或转化至宿主细胞中,得到重组细胞,诱导所述重组细胞表达。

[0030] 在本发明的一些实施方案中,所述制备方法包括诱导本发明第四方面所述的重组细胞表达的步骤。

[0031] 本发明第六方面提供本发明第一方面任一所述的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于检测生物样本中抗THSD7A抗体的标准品的应用。

[0032] 本发明的有益效果

相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

本发明利用噬菌体展示技术获得了特异性强、亲和力高的抗THSD7A单克隆抗体,其为嵌合抗体,制备方法简单、来源可靠且批间稳定性好。

[0033] 利用本发明的单克隆抗体作为检测THSD7A自身抗体的标准品,特异性好、灵敏度高、亲和力强,能够对pMN进行更加全面地诊断和预防,具有重大的临床应用价值。

附图说明

- [0034] 图1示出了本发明嵌合单抗rhA3的电泳检测结果。
- [0035] 图2示出了本发明嵌合单抗rhA3结合人源THSD7A的亲合性曲线,其中,横线代表检出限。
- [0036] 图3示出了抗THSD7A人血清标准品的标准曲线。
- [0037] 图4示出了嵌合单抗rhA3作为标准品的标准曲线。

具体实施方式

[0038] 除非另有说明、从上下文暗示或属于现有技术的惯例,否则本申请中所有的份数和百分比都基于重量,且所用的测试和表征方法都是与本申请的提交日期同步的。在适用的情况下,本申请中涉及的任何专利、专利申请或公开的内容全部结合于此作为参考,且其等价同族专利也引入作为参考,特别这些文献所披露的关于本领域中的相关术语的定义。如果现有技术中披露的具体术语的定义与本申请中提供的任何定义不一致,则以本申请中提供的术语定义为准。

[0039] 为了使本发明所解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。

[0040] 以下例子在此用于示范本发明的优选实施方案。本领域内的技术人员会明白,下述例子中披露的技术代表发明人发现的可以用于实施本发明的技术,因此可以视为实施本发明的优选方案。但是本领域内的技术人员根据本说明书应该明白,这里所公开的特定实施例可以做很多修改,仍然能得到相同的或者类似的结果,而非背离本发明的精神或范围。

[0041] 除非另有定义,所有在此使用的技术和科学的术语,和本发明所属领域内的技术人员所通常理解的意思相同,在此公开引用及他们引用的材料都将以引用的方式被并入。

[0042] 那些本领域内的技术人员将意识到或者通过常规试验就能了解许多这里所描述的发明的特定实施方案的许多等同技术。这些等同将被包含在权利要求书中。

[0043] 下述实施例中未作具体说明的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的仪器设备,如无特殊说明,均为实验室常规仪器设备;下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0044] 实施例 1 重组人THSD7A蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体

1. 重组人THSD7A蛋白

免疫原:重组人THSD7A蛋白,瞬时转染293T细胞表达,制备免疫原,重组人THSD7A蛋白氨基酸序列如下:

```
AAQGEAEAPTLYLWKTGPWGRCMGDECGPGGIQTRAVWCAHVEGWTTLHTNCKQAERPNNQQNCFKVC
DWHKELYDWRLGPWNQCQPVISKSLEKPLECIKGEEGIQVREIACIQKDKDIPAEDIICEYFEPKPLLEQAACLIPC
QQDCIVSEFSAWSECSKTCGSLQHRTRHVVAPPQFGGSGCPNLTEFQVCQSSPCEAEELRYSLHVGWPSTCSMPH
SRQVRQARRRGKNKEREKDRSKGVKDPEARELIKRRNRNRQNRQENKYWDIQIGYQTREVMCINKTGAADLSFC
QQEKLPMTFQSCVITKECQVSEWSEWSPCKTCHDMVSPAGTRVRTRTIRQFPIGSEKECFEFEEKEPCLSQGDGV
VPCATYGWRTTEWTECRVDPLLSQQDKRRGNQTALCGGGIQTREYVCVQANENLLSQLSTHKNKEASKPMDLKLCT
GPIPNNTQLCHIPCPTCEVSPWSAWGPCTYENCNDQQGKKGFKLRKRRTTNEPTGGSGVTGNCPHLLAIPCEEP
ACYDVKAVRLGNCEPDNGKECGPGTQVQEVVCINSDGEEVDRLCRDAIFPIPACDAPCPKDCVLSTWSTWSSCS
```

HTCSGKTTEGKQIRARSLAYAGEEGGIRCPNSSALQEVRSNEHPCTVYHWQTGPWGQCIEDTSVSSFNTTTTWN
 GEASCSVGMQTRKVICVRVNVGQVGPKKCPESLRPETVRPCLLPCKKDCIVTPYSDWTSCPSSCKEGDSSIRKQSR
 HRVIIQLPANGGRDCTDPLYEEKACEAPQACQSYRWKTHKWRRCQLVPWSVQQDSPGAQEGCGPGRQARAITCRKQ
 DGGQAGIHECLQYAGPVPALTQACQIPCQDDCQLTSSKSFSSCNGDCGAVRTRKRTLVGKSKKKECKNSHLYPLI
 ETQYPCPCDKYNAQPVGNWSDCILPEGKVEVLLGMKVQGDIKECGQGYRYQAMACYDQNGRLVETSRCNSHGYLEEA
 CIIPCPSDCKLSEWSNWSRCSKSCGSGVKVRSKWLREKPYNGGRPCPKLDHVNQAQVYEVVPCSHDCNQYLWVTEP
 WSICKVTFVNMRENCGEVQTRKVRMCQNTADGPSEHVEDYLCDPEEMPLGSRVCKLPCPEDCVISEWGPWTQCVL
 PCNQSSFRQRSADPIRQPADEGRSCPNAVEKEPCNLNKNKYHYDYNVTDWSTCQLSEKAVCGNGIKTRMLDCVRS
 GKSVDLKYCEALGLEKNWQNTSCMVECPVNCQLSDWSPWSECSQTCGLTGKMIRRRVTQPFQDGRPCPSLMDQ
 SKPCPVKPCYRWYQGQWSPCQVQEAQCGEGTRTRNISCVVSDGSADDFSKVVDEEFCADIELIIDGNKNMVLEESC
 SQPCPGDCYLKDWSSWSLQCLTCVNGEDLFGGGIQVRSRPVIIQELNQHLCPEQMLETKSCYDGCYQYKWMASA
 WKGSSRTVWCQRSDGINVTGGCLVMSQPADRSCNPPCSQPHSYCSETKTCHCEEYTEVMSSNSTLEQCTLIPVV
 VLPTMEDKRGDVKTSRAVHPTQPSSNPAGRGRTWFLQPFQPDGRLKT (SEQ ID No. 1)

现有技术中利用THSD7A蛋白对来自THSD7A相关pMN患者的血清样本进行检测时，THSD7A蛋白的N末端结构域能够被80%的患者识别。因此原因，目前现有技术中大多THSD7A蛋白的相关研究仅针对N端。在本实施例中，为了提供更加全面、准确的诊断，发明人选择全长THSD7A蛋白序列免疫小鼠。

[0045] 2. 免疫小鼠

- 1) 第1天：用生理盐水将重组人THSD7A蛋白稀释到2倍最终浓度，每针次5 μ g；
- 2) 充分混合快速免疫佐剂(购自苏州博奥龙科技有限公司)，无菌条件下取出该佐剂225 μ L与重组人THSD7A蛋白按体积1:1匀速混匀；
- 3) 通过后腿小腿肌肉注射免疫Ba1b/c小鼠，每只小鼠注射100 μ L，免疫4只小鼠；
- 4) 第21天按同样的方式加强免疫1针；
- 5) 第35天采微量血进行ELISA测定，抗体滴度 $>10^w$ ，随后即可取脾。

[0046] 3. 噬菌体抗体库的制备

小鼠脾脏提取RNA，反转录cDNA，通过PCR扩增获得scFv片段，使用限制性核酸内切酶Not I和Sfi I (NEB公司)对pCANTAN 5E质粒和scFv目的基因双酶切，再通过T4 DNA Ligase (NEB公司)连接，载体和目的基因摩尔比1:3，16 $^{\circ}$ C过夜，利用酶连反应合成重组质粒。将1 μ g纯化产物通过电击转化到50 μ L TG1感受态细胞 (Lucigen公司)中，37 $^{\circ}$ C过夜后，甘油菌抗体库构建完成，用辅助噬菌体M13K07 (NEB公司)将甘油菌库转化为噬菌体库。

[0047] 4. 单克隆抗体的筛选和测序

经过3轮固相淘筛得到抗重组人THSD7A蛋白单克隆抗体，筛选步骤如下：

重组人THSD7A蛋白 (SEQ ID No. 1) 2 μ g/mL PBS包被，4 $^{\circ}$ C过夜；次日用PBST洗涤3次，每孔加入200 μ L含2% BSA的PBS溶液，室温孵育2h；用PBST洗涤3次，每孔加入100 μ L含 10^{11} pfu的噬菌体抗体库溶液，室温孵育2h；用PBST洗涤酶标板，每孔加入100 μ L的胰蛋白酶将结合到THSD7A蛋白的噬菌体洗脱；

用2YT培养基培养50mL TG1至OD600约0.5，将洗脱的600 μ L噬菌体溶液加入菌液中，37 $^{\circ}$ C感染1h；在室温3000g离心30min取上清，在上清液中加入10mL的PEG/NaCl溶液，混匀冰上放置1h，期间隔10min混匀一次；之后室温3000g离心30min，弃上清；加入1mL无菌的

PBS溶液重悬沉淀,得到1轮淘筛富集的噬菌体抗体库;

重复以上步骤3轮,取出100 μ L噬菌体抗体库溶液,感染20mL的OD600约0.5的TG1菌液,37 $^{\circ}$ C感染1h;取200 μ L感染后菌液涂板,37 $^{\circ}$ C倒置过夜;次日各挑92个单克隆接种到2YT培养基,37 $^{\circ}$ C 220rpm培养至OD600到0.5后加入辅助噬菌体M13K07,37 $^{\circ}$ C感染1h;在室温3000g离心30min取上清,即为单克隆噬菌体溶液,执行酶联免疫吸附试验(ELISA)获得9株阳性单克隆送去测序,将抗体的轻、重链可变区核苷酸序列克隆至真核表达载体中,准备细胞瞬时转染。

[0048] 5. 细胞转染与筛选

提前复苏好待转染用的293T细胞,准备200mL,当细胞活率>98%准备转染,转染前一天传代将细胞密度调整为 2×10^6 个/mL。

[0049] 转染当天,细胞密度调整为 3×10^6 个/mL,将表达载体与PEI按照1:3混合后加入准备好的细胞中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、110rpm的摇床中培养。培养3-5天后将转染的细胞上清与对应抗原进行ELISA检测确认测出的抗体序列正确与否。

[0050] 6. 细胞上清单抗的制备与纯化

将确认的阳性表达载体进行大量表达,继续培养3-5天后,收细胞悬液,10000g离心10min取上清,利用亲和层析法进行纯化。纯化后的单克隆抗体经过化学发光免疫系统检测分析灵敏度,选择LoD最小的1株阳性单克隆,命名为A3。

[0051] 最终,小鼠抗THSD7A单抗A3的重链可变区核苷酸序列如下:

CAATCTGTTAAAGAATCCGGTGGCCGTTTAGTCACTCCTGGAGGGACCTTGACACTTACGTGTACTGT
ATCAGGTTTTTCGCTCAGTACCTATTACATGAGCTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGCAAGGGACTAGAGTGGATTGGG
TCTATCGAATCCTATGGTGATCGATACTATGCCACATGGGCAAAAGGCCGGTTCACGATATCAAAGACTTCGAGTA
CCACAGTTGACCTGAAAATGACGAGCTTAACTGCGTCTGATACCGCTACATACTTTTGCACGAGAAATGACTTGTC
CTGGGATAACGACAATATTTGGGGACCAGGGACTCTTGTCACCGTATCATCG (SEQ ID No. 2)

其编码的氨基酸序列如下:

QSVKESGGRLVTPGGTLTLCTVSGFSLSTYYMSWVRQAPGKGLEWIGSIESYGDRYYATWAKGRFTI
SKTSSSTTVDLKMTSLTASDTATYFCTRNDLSWDNDNIWPGTLVTVSS (SEQ ID No. 3)

其3个CDRs序列分别如下:

CDR-H1氨基酸序列为:TYYS (SEQ ID No. 4);

CDR-H2氨基酸序列为:SIESYGDRYYATWAKG (SEQ ID No. 5);

CDR-H3氨基酸序列为:NDLSWDNDNI (SEQ ID No. 6)。

[0052] 小鼠抗THSD7A单抗A3的轻链可变区核苷酸序列如下:

GATGTTCAAATGACTCAGACCCCTTCTCCGTCTCAGTATCGGTGGGTGGCACAGTTACGATTAATTG
TCAAGCTAGTCAGAGCGTCTATGAAACAATGAATTAAGTGGTACCAACAGAAATCTGGGCAACCCCAAAGTTG
CTTATCTATAAAGCCGGTACTCTCGCATCCGGCGTACCGTTCAGTTTTTCGGGAAGTGGGAGCGGTACCCAGTTCA
CACTAACGATATCTGACCTGGAGTGGATGACGCGGCTATTTACTATTGTCAAGGCGGATACTGGGGCAGCGCGC
CTTTGGTGGCGGAATAAGTTAGAAATCAAA (SEQ ID No. 7)

其编码的氨基酸序列如下:

DVQMTQTPSSVSVSVGGTVTINCQASQSVYGNELNHWYQQKSGQPPKLLIYKAGTLASGVPSRFSGSG
SGTQFTLTISDLECDAAIYYCQGGYWGQRAFGGGTKLEIK (SEQ ID No. 8)

其3个CDRs序列分别如下：

CDR-L1氨基酸序列为：QASQSVYGNLNLN (SEQ ID No. 9)；

CDR-L2氨基酸序列为：KAGTLAS (SEQ ID No. 10)；

CDR-L3氨基酸序列为：QGGYWGQRA (SEQ ID No. 11)。

[0053] 实施例2 重组嵌合抗体A3单抗的制备和鉴定

1. 重组嵌合抗体A3单抗的结构

本实施例的重组嵌合抗体A3单抗(嵌合单抗rhA3)是指小鼠抗THSD7A单抗A3的重链可变区(VH)及恒定区1(CH1)与人IgG4的Fc连接,形成小鼠-人杂合重链,再与小鼠抗THSD7A单抗A3的轻链可变区(VL)及小鼠κ链恒定区(CL),形成嵌合抗体。这样形成的抗体保留了与抗原THSD7A的结合能力,同时包含人抗体IgG4的Fc部分,能与HRP标记的山羊抗人IgG相结合。

[0054] 2. 嵌合单抗rhA3的制备

(1) 嵌合单抗rhA3重链

小鼠抗THSD7A单抗A3的重链恒定区1(CH1)的氨基酸序列如下：

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV
TVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI (SEQ ID No. 12)

人IgG4的Fc的氨基酸序列如下：

ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID No. 13)

由此,嵌合单抗rhA3的重链氨基酸序列如下：

QSVKESGRLVTPGGTLTLCTVSGFSLSTYYMSWVRQAPGKGLEWIGSIESYGDRIYATWAKGRFTI
SKTSSTTVDLKMTSLTASDTATYFCTRNDLSWDNDNIWPGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL
VKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI
ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID No. 14)

即依次包括小鼠抗THSD7A单抗A3的重链可变区VH氨基酸序列(SEQ ID No. 3)、重链恒定区1(CH1)的氨基酸序列(SEQ ID No. 12)和人IgG4的Fc的氨基酸序列(SEQ ID No. 13)。

[0055] 经优化,嵌合单抗rhA3的重链核苷酸序列如下：

CAATCTGTAAAGAATCCGGTGGCCGTTTAGTCACTCCTGGAGGGACCTGACACTTACGTGTACTGT
ATCAGGTTTTTCGCTCAGTACCTATTACATGAGCTGGGTGCGCCAGGCTCCCGCAAGGGACTAGAGTGGATTGGG
TCTATCGAATCCTATGGTGATCGATACTATGCCACATGGGCAAAAGCCGGTTCACGATATCAAAGACTTCGAGTA
CCACAGTTGACCTGAAAATGACGAGCTTAACTGCGTCTGATACCGCTACATACTTTGCACGAGAAATGACTTGTC
CTGGGATAACGACAATATTTGGGACCAGGACTCTTGTCACCGTATCATCGGCCAAGACAACGCCGCTAGTGTG
TATCCCCTCGCACCAGGTAGCGCGCTCAAACAACTCTATGGTTACCCTAGGCTGTCTGGTCAAAGGATACTTCC

CGGAGCCTGTAACAGTGACGTGGAATTCCGGGTCATTATCGAGTGGTGTCATACTTTCCCGCCGTCTTGCAGAG
CGATCTTTATACCCTCTCTTCCTCAGTAACAGTGCCATCGAGTACGTGGCCGAGCGAAACTGTTACCTGCAACGTC
GCACACCCTGCGTCTTCCACAAAGGTAGACAAAAAGATCGAGTCAAAAATACGGCCCCCATGTCCGCCTTGCCCCG
CTCCAGAATTCTAGGAGGGCCGTCGGTGTCTGTTCCCTCCCAAGCCAAAAGATACGTTAATGATAAGTAGGAC
TCCGGAGTTACCTGTGTCGTAGTGGACGTTAGCCAAGAAGATCCTGAGGTCCAGTTAATTGGTATGTAGACGGT
GTGGAAGTTCATAACGCCAAGACAAAACCCCGTGAGGAACAATTCAATTCTACGTACCGCGTCGTATCCGTGTTGA
CTGTTCTTACCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTCTCAAATAAAGGACTACCATCGAGTAT
TGAAAAGACCATCAGCAAAGCAAAGGGGCAACCGCGAGAGCCTCAGGTATACACACTGCCCCATCTCAAGAAGAG
ATGACGAAAAACCAGGTGTCCTTAACCTGTTTGGTTAAGGGTTTTTATCCGTCAGACATAGCGGTGCAATGGGAGT
CGAATGGCCAACCTGAAAAAATTACAAAACCACACCCCCAGTACTTGATAGTGACGGAAGCTTCTTTCTCTATTC
TCGGCTAACGGTGGATAAGTCCAGATGGCAGGAGGGGAACGTTTTCTCATGCTCGGTCATGCATGAAGCTCTGCAC
AATCATTACACTCAAAAAAGTTTAAGCTTGTCTCTTGGTAAG (SEQ ID No. 15)

(2) 嵌合单抗rhA3轻链

小鼠κ链的恒定区(CL)的氨基酸序列如下:

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM
SSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID No. 16)

由此,嵌合单抗rhA3的轻链氨基酸序列如下:

DVQMTQTPSSVSVSVGGTVTINCQASQSVYGNELNHWYQQKSGQPPKLLIYKAGTLASGVPSRFSGSG
SGTQFTLTISDLECDAAIYYCQGGYWGQRAFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPK
DINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ
ID No. 17)

即依次包括小鼠抗THSD7A单抗A3的轻链可变区VL氨基酸序列 (SEQ ID No. 8)、小
鼠κ链的恒定区(CL)的氨基酸序列 (SEQ ID No. 16)。

[0056] 经优化,嵌合单抗rhA3的轻链核苷酸序列如下:

GATGTTCAAATGACTCAGACCCCTTCTCCGTCTCAGTATCGGTGGGTGGCACAGTTACGATTAATTG
TCAAGCTAGTCAGAGCGTCTATGGAAACAATGAATTAAGTGGTACCAACAGAAATCTGGGCAACCCCAAAGTTG
CTTATCTATAAAGCCGGTACTCTCGCATCCGGCGTACCGTCACGTTTTTCGGGAAGTGGGAGCGGTACCCAGTTCA
CACTAACGATATCTGACCTGGAGTGCATGACGCGGCTATTTACTATTGTCAAGGCGGATACTGGGGCAGCGCGC
CTTTGGTGGCGGAACTAAGTTAGAAATCAAACGAGCAGATGCGGCTCCTACCGTGCCATATCCCCCATCATCG
GAGCAATTGACAAGTGGGGGTGCCAGCGTTGTCTGCTTTCTTAATAACTTCTATCCGAAGGACATTAATGTAAAT
GGAAGATCGATGGCTCTGAACGGCAGAACGGAGTGCTCAATTCCTGGACGGACCAAGATTCAAAGACTCGACTTA
CAGTATGAGCTCTACCTAACACTGACGAAGGATGAGTATGAAAGACATAACTCCTACACTTGTGAGGCAACCCAC
AAAACATCAACGTCGCTATAGTTAAGAGTTTTAATAGGAACGAATGC (SEQ ID No. 18)

(3) 嵌合单抗rhA3的制备

本实施例的嵌合单抗rhA3的制备方法包括如下步骤:

将上述重链核苷酸序列和轻链核苷酸序列分别构建至pcDNA3.4表达载体,转染
HEK-293细胞,通过Protein A纯化获得嵌合抗体,通过SDS-PAGE电泳确认得到的rhA3抗体
轻重链完整,条带清晰,抗体纯度>95%,如图1所示,将纯化后的抗体定量、分装、冻存后备
用。

[0057] 经鉴定,所得嵌合单抗rhA3包括重链和轻链。

[0058] 3. 嵌合单抗rhA3结合人源THSD7A (hTHSD7A) 效果

重组人THSD7A蛋白 (SEQ ID No. 1) 0.2 μ g/孔 (2 μ g/mL, 加100 μ L) 包被在96孔微孔板, 4 $^{\circ}$ C过夜; 2% BSA在37 $^{\circ}$ C封闭2h; 分别加入不同浓度的嵌合单抗rhA3, 37 $^{\circ}$ C孵育1h; PBST洗板3次后加入HRP标记的山羊抗人IgG (Thermo公司), 37 $^{\circ}$ C孵育0.5h; PBST洗板5次后加入TMB显色液 (上海碧云天生物技术有限公司), 37 $^{\circ}$ C孵育10min后加入2M硫酸终止反应, 测定OD450。

[0059] 结果如图2所示, 表明嵌合单抗rhA3与THSD7A抗原结合的同时能够被抗人IgG二抗识别。

[0060] 实施例3 嵌合单抗rhA3作为标准品检测抗THSD7A人血清标准品

1. 抗THSD7A人血清标准品, 检测嵌合单抗rhA3

具体检测方法如下:

重组人THSD7A蛋白 (SEQ ID No. 1) PBS稀释至2 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; PBST洗板3次, 2% BSA, 200 μ L/孔在37 $^{\circ}$ C封闭2h; PBST洗板3次, 使用抗THSD7A人血清标准品 (科翰盛生物公司), 共5个浓度点 (320U/mL、160U/mL、80U/mL、40U/mL、20U/mL), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育1h; 稀释嵌合单抗rhA3 (同实施例2) 至最高浓度为100ng/mL, 5倍梯度稀释共3个浓度点 (100ng/mL、20ng/mL、4ng/mL), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育1h; PBST洗板3次, 加入HRP标记的山羊抗人IgG, 37 $^{\circ}$ C孵育0.5h; PBST洗板5次, 加入TMB显色液100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育10min后加入2M硫酸终止反应, 测定OD450。以抗THSD7A人血清标准品测定值采用ELISA拟合计算程序绘制标准曲线并计算嵌合单抗rhA3的值。

[0061] 结果如图3所示, 可以看出标准品检测符合四参数回归方法, 拟合曲线相关系数 R^2 值大于0.99。

[0062] 检测嵌合单抗rhA3数据如表1所示。

[0063] 表1 检测嵌合单抗rhA3数据

rhA3 (ng/mL)	OD450	计算值 (U/mL)	比活 (U/ng)
100	2.75	304.783	3.04783
20	0.8092	59.8661	2.9933
4	0.1436	12.0304	3.0076

[0064] 从表1中可以看出, 本实施例检测了嵌合单抗rhA3的3个浓度, 即100ng/mL、20ng/mL和4ng/mL, 依次代入血清标准曲线测得含有THSD7A抗体浓度分别为304.783U/mL、60.4501U/mL和12.0304 U/mL, 对应比活分别为3.04783U/ng、2.9933U/ng和3.0076U/ng, 结果一致。可以确定嵌合单抗rhA3每ng含有约3.0U THSD7A抗体活性。

[0065] 2. 嵌合单抗rhA3作为标准品, 检测抗THSD7A人血清标准品

将嵌合单抗rhA3作为标准品, 检测抗THSD7A人血清标准品 (同上), 具体检测方法如下:

重组人THSD7A蛋白 (SEQ ID No. 1) PBS稀释至2 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; PBST洗板3次, 2% BSA, 200 μ L/孔在37 $^{\circ}$ C封闭2h; PBST洗板3次, 稀释嵌合单抗rhA3 (同实施例2) 至最高浓度为100ng/mL, 2倍梯度稀释共7个浓度点 (100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C孵育1h; 稀释抗THSD7A人血清标准

品至300U/mL,5倍梯度稀释共3个浓度点(300U/mL、60U/mL、12U/mL),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST洗板3次,加入HRP标记的山羊抗人IgG,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;PBST洗板5次,加入TMB显色液100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育10min后加入2M硫酸终止反应,测定OD450。以嵌合单抗rhA3标准品测定值采用ELISA拟合计算程序绘制标准曲线并计算抗THSD7A人血清标准品的值。

[0066] 结果如图4所示,抗THSD7A人血清标准品检测符合四参数回归方法,拟合曲线相关系数 R^2 值大于0.99。

[0067] 检测抗THSD7A人血清标准品数据如表2所示。

[0068] 表2 检测人血清标准品数据

抗THSD7A人血清标准品 (U/mL)	OD450	计算值 (ng/mL)	比活 (U/ng)
300	2.688	101.005	2.9703
60	0.623	20.169	2.9749
12	0.1268	3.984	3.012

[0069] 从表2中可知,本实施例检测了抗THSD7A人血清标准品高中低3个活性浓度,即高浓度300U/mL、中浓度60U/mL和低浓度12U/mL,依次代入嵌合单抗rhA3标准曲线测得含有抗THSD7A抗体浓度分别101.005ng/mL、20.169ng/mL和3.984ng/mL,对应比活分别为2.97U/ng、2.97U/ng和3.01U/ng,结果一致,与标识活性3.0U/ng误差依次为-2.97%,-2.51%,1.2%,均 $\leq \pm 5\%$,表明嵌合单抗rhA3可以替代人血清作为标准品。

[0070] 实施例4 嵌合单抗rhA3作为标准品联合抗THSD7A人血清标准品检测患者血清样本

重组人THSD7A蛋白(SEQ ID No. 1)PBS稀释至2 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜;PBST洗板3次,2% BSA,200 μ L/孔在37 $^{\circ}$ C封闭2h;PBST洗板3次,稀释嵌合单抗rhA3至最高浓度为100ng/mL,2倍梯度稀释共7个浓度点(100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;同时用稀释液做空白对照;用抗THSD7A人血清标准品(科翰盛生物公司),共5个浓度点(320U/mL、160U/mL、80U/mL、40U/mL、20U/mL),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;同时稀释患者血清样本101倍,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;同时用稀释液做空白对照;PBST洗板3次,加入10000倍稀释的HRP标记的山羊抗人IgG(Thermo公司),37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;PBST洗板5次,加入TMB显色液(碧云天公司)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育10min后加入2M硫酸终止反应,测定OD450。

[0071] 采用ELISA拟合计算程序绘制标准曲线并计算各血清样本对应的THSD7A自身抗体含量,并且和定量限比较,得出阳性例,结果如表3所示。

[0072] 表3 血清样本检测结果

性能	特发性膜型肾病			其他肾病			健康人		
	THSD7A (货号: FB 1254-1010-1)	抗 THSD7A 人血清标准品	嵌合单抗 rhA3 标准品	THSD7A (货号: FB 1254-1010-1)	抗 THSD7A 人血清标准品	嵌合单抗 rhA3 标准品	THSD7A (货号: FB 1254-1010-1)	抗 THSD7A 人血清标准品	嵌合单抗 rhA3 标准品
检测例	62	62	62	0	48	48	0	100	100
阳性例	7	6	7	0	0	0	0	0	0
阳性检出率 (%)	/	85.7	100	/	0	0	/	0	0
检测特异性 (%)	/	/	/	/	100	100	/	100	100

[0073] 从表3中可知,两种标准品方法检测了62例特发性膜型肾病患者血清中抗THSD7A抗体的含量,利用THSD7A(货号:FB 1254-1010-1)测试出7例阳性,由实验中标准品的稀释倍数得出,抗THSD7A人血清标准品的定量限20U/mL,而嵌合单抗rhA3标准品的定量限小于10U/mL;抗THSD7A人血清标准品的检测阳性率(与THSD7A,货号:FB 1254-1010-1比较)为85.7%,而嵌合单抗rhA3标准品的检测阳性率为100%,并且在48例其他肾病和100例健康人中,均无一例阳性。

[0074] 以上结果说明:嵌合单抗rhA3作为标准品较抗THSD7A人血清标准品定量限低,阳性检出率高,其余检测结果均100%一致。

[0075] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

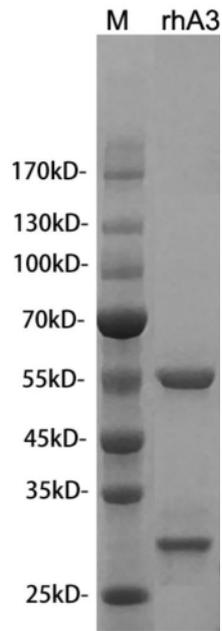


图1

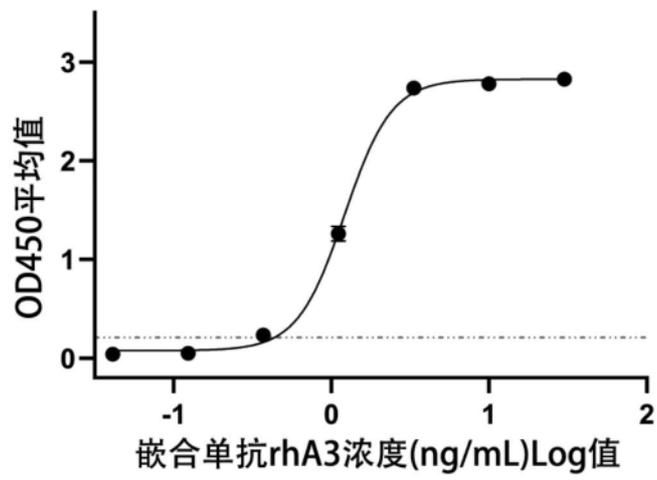


图2

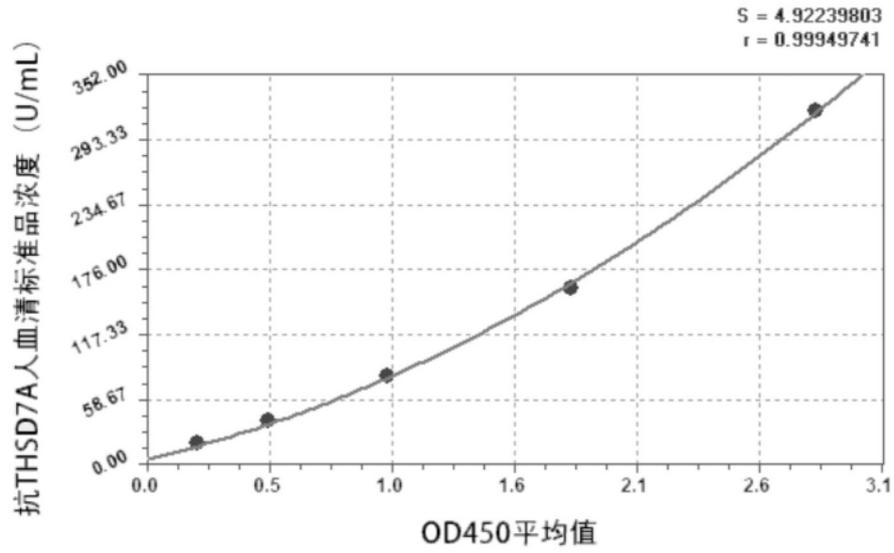


图3

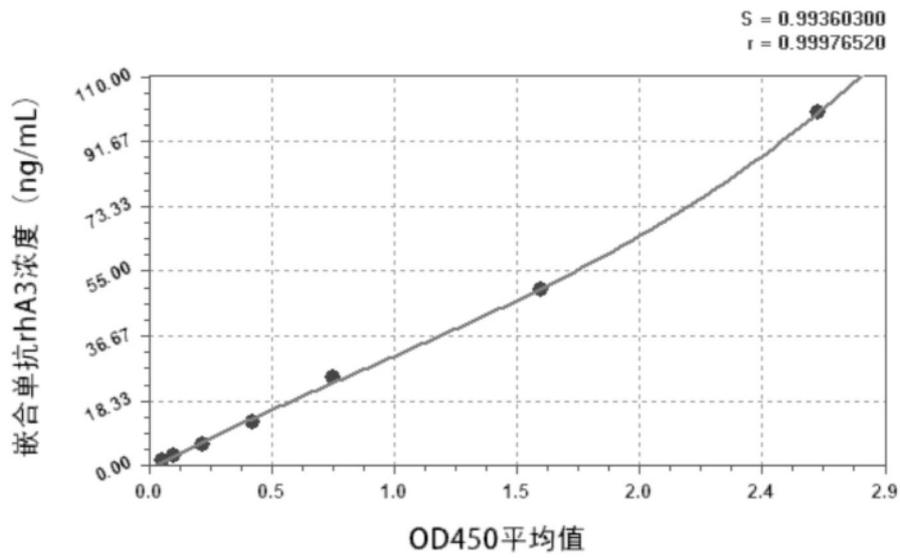


图4